

Accession Nbr :

1986-064968 [10]

Sec. Acc. CPI :

C1986-027741

Sec. Acc. Non-CPI :

N1986-047524

Title :

Fixation of physiological active substances - by irradiating aq. medium contg. protein, di:functional vinyl monomer and vinyl monomer to form carrier

Derwent Classes :

A96 B04 D16 S03

Patent Assignee :

(AJIN) AJINOMOTO KK

(JAAT) JAPAN ATOMIC ENERGY RES INST


Nbr of Patents :

1

Nbr of Countries :

1

Patent Number :

 JP61015898 A 19860123 DW1986-10 4p *

AP: 1984JP-0134549 19840629

Priority Details :

1984JP-0134549 19840629

IPC s :

A61K-039/38 C07K-017/08 C12N-011/02 G01N-033/54

Abstract :

JP61015898 A

Fixation of physiological active substance, an aq. medium contg. (1) (a) a protein, (b) a di-functional vinyl monomer and (c) a hydrophilic monofunctional vinyl monomer or (2) (a) and (c) or (3) (b) and (c) is irradiated with light or an ionizing radiation to form a carrier, and then a physiological active substance and a ecrosslinkinge agent are added to the carrier-contg. aq. medium thereby to fix the physiological active substance to the carrier.

Pref. (a) are beta-globulin, egg albumin, bovine serum albumin, fibrinogen, casein, peptone, ribonuclease, esterase, pepsine, etc. (b) are dimethylacrylates, diacrylates, methylene-bis-acrylamides, etc. (c) are hydroxyethyl methacrylate, hydroxyethyl acrylate, hydroxypropyl

methacrylate, hydroxypropyl acrylate, hydroxybutyl methacrylate, hydroxybutyl acrylate, glycol dimethacrylate, triethyleneglycol dimethacrylate, polyethyleneglycol 200 dimethacrylate, polyethyleneglycol 400 dimethacrylate, diethyleneglycol diacrylate, diethyleneglycol dimethacrylate, triethyleneglycol diacrylate, trimethylolpropane trimethacrylate, trimethylolethane trimethacrylate, etc. Examples of physiological active substances to be fixed are alpha-amylase, beta-amylase, glycoamylase, cellulase, hemicellulase, beta-glucosidase, urease, alcohol-dehydrogenase, lactic acid-dehydrogenase, glucose, oxydase, D-amino acid-oxidase, arginase, glucose-isomerase, L-glutaric acid-decarboxylase, alkaline protease, acid protease, etc.

USE/ADVANTAGE - A physiological active substance (e.g. enzyme, cell, antibody, antigen) may firmly be fixed on the carrier with high concn.. The fixation may be utilised in various fields of industrial mfr. of medicines, foods, cosmetics, etc.

Manual Codes :

CPI: A03-C01 A04-F06E5 A08-D01 A10-B06 A10-C03C A12-V01 A12-W09 A12-W11L B04-B02C B04-B04A6 B04-B04D2 B04-B04D3 B04-B04K B04-C03B D05-A01A2 D05-H10
EPI: S03-E14H4

Update Basic :

1986-10

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-15898

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)1月23日

C 07 K 17/08
A 61 K 39/385
39/44
C 12 N 11/02
11/08
G 01 N 33/543

6464-4H
7043-4C
7043-4C
7235-4B
7235-4B
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 生物活性物質を固定化する方法

⑯ 特 願 昭59-134549

⑰ 出 願 昭59(1984)6月29日

⑱ 発 明 者 熊 倉 稔 高崎市並榎町170-1
⑱ 発 明 者 玉 田 正 男 高崎市上佐野町1090
⑱ 発 明 者 笠 井 昇 高崎市並榎町170-1
⑱ 発 明 者 嘉 悦 勲 高崎市並榎町170-1
⑱ 発 明 者 山 中 茂 横浜市南区大岡3-40-13
⑲ 出 願 人 日本原子力研究所 東京都千代田区内幸町2丁目2番2号
⑲ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
⑳ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外5名

明 細 書

1. [発 明 の 名 称]

生物活性物質を固定化する方法

2. [特 許 請 求 の 範 囲]

1. 蛋白質及び/又は二官能性ビニル系単量体及び親水性の一官能性ビニル系単量体を含有する水性媒体に光または電離性放射線を照射して担体を製造し、次いで該担体を含む水性媒体中に生物活性物質及び架橋剤を添加し該担体に生物活性物質を固定化させることを特徴とする生物活性物質を固定化する方法。

3. [発 明 の 詳 細 な 説 明]

1. 発 明 の 目 的

産業上の利用分野

本発明は生物活性物質の固定化法に関する。

本発明は医薬品製造工業、食品工業、化粧品工業等に利用される。

従 来 の 技 術

酵素、生物細胞、細胞内小器官、抗体、抗原等生物活性物質を利用して有用な反応を行わせしめ

(1)

医薬品および食料品などを製造する医薬食品工業は近年益々発展を遂げつつある。

例えば、酵素を例にとると、酵素は食品工業、医薬品工業、化粧品工業等の分野で、通常の化学触媒では効率よく行い得ない反応を有効に進め得る物質として使用され、多くのプロセスにおいて不可欠のものとなつてゐる。しかしながら、従来の酵素反応は、酵素をそのまま水相で使用して、反応後これを使いすてにするのが通例であり、ためにほとんどの酵素反応プロセスは回分式で行われているのが常である。従つて、酵素を水に不溶の形に固定して反復使用することが可能となれば、酵素反応プロセスを連続化することができる。このような形に酵素を固定化する方法としては、酵素を水に不溶の物質、たとえば、合成高分子のフィルムやビーズなどに反応させた化学結合させる方法があるが、酵素活性は分子の構造やその配位の変位に鋭敏であつて、他分子と化学結合させる場合には活性の低下が著るしい欠点があり、この方法は実用的に成功しているとはいえない。又、

(2)

酵素を水に不溶の合成高分子等の内部に包括し、これを多孔質構造化して固定化する方法もあり、たとえば、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコールなどによる包括が試みられているが、これらの方法は水に膨潤性の強い高分子を使用するので重合体は水を含んだすまのなないゲルとなり、多孔質化して基質が入り出ることができるようにするには、脱水、乾燥、粉碎などの後処理工程が必要となり、煩雑で非効率的であるばかりか、その間に酵素の脱離、失活の機会がふえる欠点がある。また、酵素を直接、単に包括する場合の活性率は低下する場合が多く、長期間使用により酵素が脱離する恐れがある点は解消しない。

いずれにしても、従来技術の生物活性物質固定化法は生物活性物質の活性率、固定化効率等に欠点があつた。

発明が解決しようとする問題点

本発明によつて固定化効率が悪いという従来技術の欠点の一つが解決される。

更に、本発明によつて生物活性物質を高濃度で

(3)

又、蛋白質に着目するならば本発明は蛋白質を使用する系と使用しない系に分類することが出来る。以下、本発明の構成を詳細に説明する。

蛋白質を用いる本発明の方法は蛋白質及び／又は二官能性ビニル系単量体及び親水性の一官能性ビニル系単量体を含有する水性媒体に電離性放射線を照射して担体を作製し、次いで該担体を含む水性媒体中に生物活性物質及び架橋剤を添加し該担体に生物活性物質を固定化させることを特徴とする。本発明の当該方法はビニル系単量体に光または電離性放射線を照射して得られる重合体に蛋白質を高濃度で固定することによつて多孔質の担体を形成させ、この担体の表面の蛋白質に生物活性物質を架橋剤で結合させるものである。

当該方法に使用されるビニル系単量体は親水性でも疎水性でもよい。親水性ビニル系単量体を使用する場合は例えば0～100℃という過冷却の状態で水を凍らせて重合させることにより表面積の極めて大きい多孔性重合体を形成させることが出来、生物活性物質は多孔性重合体の空孔に結

(5)

強固に固定化する簡便な方法が解決される。

本発明によつて解決される問題点は以下逐次明かにされる。

ロ. 発明の構成

問題点を解決するための手段

上述した問題点は、蛋白質及び／又は二官能性ビニル系単量体及び親水性の一官能性ビニル系単量体を含有する水性媒体に電離性放射線を照射して担体を作製し、次いで該担体を含む水性媒体中に生物活性物質及び架橋剤を添加し該担体に生物活性物質を固定化させることを特徴とする生物活性物質を固定化する方法によつて解決される。

本発明は生物活性物質を固定する担体を製造する成分として：

- (1) 蛋白質、二官能性ビニル系単量体および親水性の一官能性ビニル系単量体を使用する系、
- (2) 蛋白質および親水性の一官能性ビニル系単量体を使用する系、および
- (3) 二官能性ビニル系単量体および親水性の一官能性ビニル系単量体を使用する系を包含する。

(4)

台された状態になる。一方、疎水性ビニル系単量体を使用する場合は重合体は直径10～100μmの粒子状になり、生物活性物質はその表面の蛋白質に結合された状態になる。

上述した蛋白質を使用する本発明の方法の場合、使用する成分の配合割合は成分の総重量当り蛋白質は5～50%および単量体は10～80%で親水性単量体の場合は20～80%、疎水性単量体の場合は10～50%の範囲が好ましい。生物活性物質は1～5%そして架橋剤濃度は1～3%の範囲で使用される。担体を製造するための反応条件、光または電離性放射線は0～100℃の範囲で0.5～1.0 Mrad照射される。

本発明の別法は担体の構成成分として蛋白質を使用しない方法で、二官能性ビニル系単量体及び親水性の一官能性ビニル系単量体を含有する水性媒体に光または電離性放射線を照射して担体を作製し、次いで該担体を含む水性媒体中に生物活性物質及び架橋剤を添加し該担体に生物活性物質を固定化させることを特徴とする。本発明の当該方

(6)

法は、ビニル系単量体に光または電離性放射線を照射して担体を形成させ、担体を水で膨潤させることにより表面をゲル化させ多孔質化してその表面の官能基と生物活性物質を架橋剤で結合させるものである。当該方法に使用される各成分の配合割合は成分の総重量当り二官能性ビニル系単量体は0.05～1%で全単量体は10～50%の範囲であり、生物活性物質は1～5%そして架橋剤は1～3%の範囲である。担体を製造するための反応条件は室温で0.5～1.0 Mrad照射される。担体を水で膨潤後1～5%の生物活性物質と1～3%の架橋剤を含む水溶液に室温で5～6時間浸漬させることによつて生物活性物質は担体表面の官能基と結合される。

本発明は多孔性の担体の空孔を有効に活用することを特徴の一つとするものであるが多孔性は二官能性ビニル系単量体あるいは蛋白質又は親水性一官能性ビニル系単量体の量比により0.1～1000μの範囲、好ましくは1～100μの範囲でコントロールすることが出来る。

(7)

プロテイン、ペプトン、ミオグロビン、フェリチン、バクテリオロドプシン、ルブレドキシン、キモトリプシン、リボヌクレアーゼ、パパイイン、サーモリシン、チオレドキシン、フラボドキシン、ヘキソキナーゼ、ホリホリラーゼ、カルボキシペプチダーゼA、卵白リゾチーム、チトクロム、トロンビン、エラスターゼ、ペプシン、エラスチン、プロタミンなどが例示される。

本発明で使用される二官能性ビニル系単量体はジメタアクリルエステル、ジアクリルエステル、メチレンビスアクリルアミド等が具体的に例示される。

本発明で使用される親水性一官能性ビニル系単量体は0℃以下の温度においてその単量体がガラス転移温度より高ければ結晶化せず過冷却状態を呈し、かつガラス転移温度より50℃高い温度付近に0℃以下の重合温度領域での最大重合初速度を有する単量体のことで、ヒドロキシエチルメタアクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシプロピルメタアクリレート、ヒドロキ

(9)

本発明で使用されるタンパク質に関して論及するとタンパク質はそれらの種類によつて分類されるが、例えば(a)成分の相違による分類(単純タンパク、複合タンパク、誘導タンパク質)、(b)生産場所による分類(動物タンパク質、植物タンパク質)、(c)生理作用に基づく分類(酵素タンパク質、ホルモンタンパク質、毒素タンパク質)、(d)分子形状に基づく分類(繊維状タンパク質、球状タンパク質)、(e)電気化学的性質の差に基づく分類

(中性、酸性および塩基性タンパク質)を挙げることができ、その具体例として、β-グロブリン、γ-グロブリン、卵白アルブミン、乳アルブミン、牛血清アルブミン、ヒト血清アルブミン(一般の血清アルブミン、ロイコシン、ヘモグロビン、ゼラチン)、α-リボプロテイン、β-リボプロテイン、フィブリノーゲン、オボアルブミン、コンアルブミン、カゼイン、オイプロブリン、ブソイドグロブリン、グルテニン、グリアジン、インシュリン、グルタチオン、ペクチン、卵白、プロラミン、グルテリン、ヒストン、プロタミン、メタ

(8)

シプロピルアクリレート、ヒドロキシブチルメタアクリレート、ヒドロキシブチルアクリレート、グリコールジメタアクリレート、トリエチレングリコールジメタアクリレート、ポリエチレングリコール#200ジメタアクリレート、ポリエチレングリコール#400ジメタアクリレート、ポリエチレングリコール#600ジメタアクリレート、ジエチレングリコールジアクリレート、ジエチレングリコールジメタアクリレート、トリエチレングリコールジアクリレート、ポリエチレングリコール#200ジアクリレート、ポリエチレングリコール#400ジアクリレート、ポリエチレングリコール#600ジアクリレート、トリメチロールプロパントリメタアクリレート、トリメチロールエタントリメタアクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、トリメチロールエントリアクリレート、グリンジルメタアクリレート等々が例示される。

本発明で使用される架橋剤はカルボキシジイミド、グルタルデヒド等従来より高分子物質の架橋

(10)

剤として使用されているものでよい。

本発明で使用する生物活性物質は酵素、生物細胞、細胞内小器官、抗体、抗原等であるが、特に本発明の効果が顕著であり、本発明を適用するのに好適な酵素もしくは菌体の具体例としては、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グリコアミラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、 β -グルコシダーゼ、インペルターゼ、ウレアーゼ、アルコール脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、グルコース、オキシダーゼ、ヘキソキナーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ、アルギナーゼ、パペイン、レニン、トリプシン、グルコースイソメラーゼ、L-グルタル酸脱炭酸酵素、アルカリ性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ、等が例示される。

本発明を実施するにあつて採用される線源は低圧または高圧水銀灯からの可視および紫外光、太陽光、フोटオンファクトリーからの光、X線、ガンマ線、ベータ線、アルファ線、電子線のいずれでもよい。照射線量は 1×10^5 、電離性放射線の場合 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6 R$ /時の線量率 (11)

れに室温にて $1.0 M rad$ の電離性放射線を照射して重合させた。重合物をペレット状に切り水中に5日間浸漬し膨潤させ、その後これをセルラーゼ(オノズカQ R-10)2%およびカルボジイミド1%を含む水溶液に入れ室温にて5時間反応させた。反応後水および0.1 M酢酸バッファー液にて洗浄した。この固定化物10gをとり、5%セルロース粉末スラリー(400~500メッシュ)20mlに入れ40℃で48時間糖化反応を行わせしめた後生成グルコース濃度を測定した結果1.2%であつた。

実施例 3

卵白アルブミン0.25部、ジエチレングリコールジメタクリレート0.25部、アクリル酸4.55部および水50部、とを混合し、これに室温にて $1.0 M rad$ の電離性放射線を照射して重合させた。重合物をペレット状に切り、ついで水の中に5日間浸漬し膨潤させた。その後この重合物を「アミラーゼ」(生化学工業製)1.0%およびカルボジイミド0.5%を含む水溶液に入れて室温で6時間 (13)

で好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 R$ の照射線量が必要である。

以下実施例により本発明を具体的に説明する。尚、"部"は全配合物の重量当りである。

実施例 1.

卵アルブミン5部、ヒドロキシエチルメタクリレート30部および水65部とを混合し、これを-78℃に冷却して $1.0 M rad$ 電離性放射線を照射して重合させた。これを室温にもどし、ペレット状に切り、セルラーゼ(オノズカR-10)1部を加えグルタルアルデヒド水溶液(2.5%)50部を加えて室温にて1時間放置した後水および0.1 M酢酸バッファー液にて洗浄して固定化物を得た。この固定化物10gを5%のセルロース粉末スラリー(300~500メッシュ)と40℃で48時間の糖化反応を行つたところグルコース濃度が0.8%となつた。

実施例 2

メタクリル酸45.5部、および水50部、メチレンビスメタクリルアミド0.5部とを混合し、こ (12)

反応させた。反応後、酵素固定化物を水および0.1 Mリン酸バッファー液(pH 7.0)にて洗浄した。この固定化物を用い、デンプン10%水溶液の加化分解反応を40℃で1時間行つた。同様に、固定化に用いた活性アミラーゼについて同じ条件で加水分解反応を行い、生成されたグルコース量の比較から固定化物の酵素活性率を求めた結果76%であつた。

特許出願人 日本原子力研究所

同 味の素株式会社

代理人 弁理士 湯 浅 恭



(外5名)

(14)